

2-Hydroxyphenyl-substituted 1,2,4-triazoles and 1,2,4-oxadiazoles, their use as pharmaceutical agents and pharmaceutical compositions containing them

Publication number: DE4320801 (A1)

Publication date: 1995-01-05

Inventor(s): MARSCHNER FRANK [DE]; KAESTNER GERD [DE]; KUPKA FRANK [DE]; LUECKE LOTHAR DR RER NAT [DE]; NUHN PETER PROF DR [DE]; RUNGE HANS-JOACHIM DR RER NAT [DE] +

Applicant(s): FAHLBERG LIST PHARMA GMBH [DE] +

Classification:

- International: A61K31/41; A61K31/41; (IPC1-7): A61K31/41

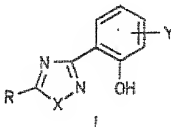
- European: A61K31/41

Application number: DE19934320801 19930623

Priority number(s): DE19934320801 19930623

Abstract of DE 4320801 (A1)

Pharmaceutical developments to date targeted at the lipoxigenase-mediating arachidonic acid metabolism have concentrated almost exclusively on 5-lipoxigenase, and the described inhibitor substances are associated with complicated ways of synthesis. 2-Hydroxyphenyl-substituted 1,2,4-triazoles and 1,2,4-oxadiazoles of the general formula I have the property of inhibiting 5-lipoxigenase. The compounds according to the invention have a relatively simple structure and can easily be prepared by reacting amidines with salicyl hydrazides or amide oximes with carbonyl chlorides. The compounds according to the invention are used as pharmaceutical agents with wide therapeutic applicability, such as for the therapy and prophylaxis of bronchial asthma, psoriasis, inflammatory and allergic disorders, in which R, X and Y have the meaning stated in Claim 1.



Data supplied from the espacenet database — Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 43 20 801 A 1

51 Int. Cl. 5:
A 61 K 31/41

21 Aktenzeichen: P 43 20 801.0
22 Anmeldetag: 23. 6. 93
43 Offenlegungstag: 5. 1. 95

DE 43 20 801 A 1

71 Anmelder:

Salutas Fahlberg-List Pharma GmbH, 39122
Magdeburg, DE

72 Erfinder:

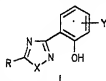
Marschner, Frank, 39128 Magdeburg, DE; Kästner,
Gerd, 39118 Magdeburg, DE; Kupka, Frank, 02681
Wilthen, DE; Lücke, Lothar, Dr.rer.nat., 39120
Magdeburg, DE; Nuhn, Peter, Prof. Dr.habil., 04299
Leipzig, DE; Runge, Hans-Joachim, Dr.rer.nat., 39118
Magdeburg, DE

54 2-Hydroxyphenylsubstituierte 1,2,4-Triazole und 1,2,4-Oxadiazole, ihre Verwendung als pharmazeutische Wirkstoffe und sie enthaltende Arzneimittel

57 Bisherige Arzneimittelentwicklungen in Zielrichtung auf den lipoxigenasevermittelnden Arachidonsäurestoffwechsel konzentrieren sich fast ausschließlich auf die 5-Lipoxygenase, wobei die beschriebenen Inhibitorsubstanzen komplizierte Synthesewege beinhalten.

2-Hydroxyphenylsubstituierte 1,2,4-Triazole und 1,2,4-Oxadiazole der allgemeinen Formel I haben die Eigenschaft die 5-Lipoxygenase zu hemmen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen eine relativ einfache Struktur auf und sind leicht durch Umsetzung von Amidinen mit Salicylhydraziden bzw. von Amidoximen mit Carbonsäurechloriden herzustellen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen dienen als Wirkstoffe für Arzneimittel mit breiter therapeutischer Anwendbarkeit, wie z. B. zur Therapie und Prophylaxe von Asthma bronchiale, Psoriasis, entzündlichen und allergischen Erkrankungen.



worin R, X und Y die im Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben.

DE 43 20 801 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 94 408 061/117

5/33

Beschreibung

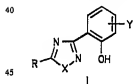
Die Erfindung betrifft 2-Hydroxyphenylsubstituierte 1,2,4-Triazole und 1,2,4-Oxadiazole mit lipoxigenasemehmenden Eigenschaften sowie ihre Verwendung als pharmazeutische Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln. Die erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich zur Therapie aller Formen des Asthma bronchiale sowie von entzündlichen und allergischen Erkrankungen im weitesten Sinne.

Die Verwendung von 1,2,4-Oxadiazolen und 1,2,4-Triazolen im o.g. Therapiebereich ist für 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-[2-(N,N-diethylamin)-ethyl]-1,2,4-oxadiazol (L. B. Clapp, Adv. Heterocycl. Chem. 20, (1976), 65) in der Literatur beschrieben, wobei die dort angegebene analgetische und entzündungshemmende Wirkung dieser Substanz durch keinerlei Angaben biologischer Untersuchungen nachgewiesen wurde. In einer Reihe von Patentschriften (DE 14 45 603, DE 14 45 620, DE 15 45 699, DE 17 95 839, alle K.Harsanyi u. a.) werden 3,5-disubstituierte 1,2,4-Oxadiazole beschrieben, die lokalnästhetische, spasmolytische und hustenstillende Eigenschaften haben; die zum Teil (DE 14 45 603) mit eingeschlossenen Hydroxyphenyl-Derivate und dabei insbesondere die 2-Hydroxyphenylsubstituierten Verbindungen sind jedoch weder bei der Herstellung noch bei der Wirkung mit Beispielen belegt.

Die in den Patentschriften DE 28 19 372, DE 23 58 011 und DE 22 65 212 (alle A. Omodei-Sale u. a.) beschriebenen 1,2,4-Triazole sowie die in den Patenten EP 504574 (M. Ebie u. a.) und EP 492249 (W. Lindner) aufgeführten 1,2,4-Oxadiazole weisen andere Wirkungsrichtungen (Antiparkinsonmittel bzw. ZNS-beruhigende Wirkung) auf.

Es ist bekannt, daß die durch die Enzymfamilie der Lipoxigenasen gebildeten Oxygenierungsprodukte der Arachidonsäure und anderer Polyfetttsäuren maßgeblich am Symptomenkomplex einer Vielzahl entzündlicher und allergischer Erkrankungen sowie anderer Störungen beteiligt sind (vgl. Samuelsson, B. u. a., Science 237, (1987), 1171; Parker, C.W., Ann. Rev. Immunol. 5, (1987), 65; Drazen, J.M., Austen, K.P., Am. Rev. Respir. Dis. 136, (1987), 985; Hagemann, W., Keppler, D., The Liver, Biology and Pathobiology, 2nd Ed. (Arias, I.M. et al., eds) Raven Press, New York, 1988, S. 793 ff.; Malle et al., Int. J. Biochem. 19, (1987), 1013; Feuerstein, G., Hallenbeck, S.M., FASEB J. 1, (1987), 186. Daraus leitet sich ab, daß durch Hemmung der Lipoxigenasereaktion günstige therapeutische Effekte bei der medikamentösen Behandlung der entsprechenden Erkrankungen erzielt werden können. Seit längerer Zeit bekannte Lipoxigenasemhemmer, wie Nordihydroguajarsäure, 3-Amino-1-(3-trifluormethylphenyl)-pyrazolin und 5,8,11,14-Eicosatetraensäure, zeigen entweder keine hinreichenden therapeutischen Wirkungen in vivo oder sind zu toxisch. Auch neuere Entwicklungen von Lipoxigenasemhemmern brachten aus gleichen Gründen keinen Durchbruch. Andererseits ergibt sich aus dem gegenwärtigen Stand der Forschungen auf dem Gebiet des Arachidonsäurestoffwechsels, daß Lipoxigenasemhemmer größere Chancen für eine Arzneimittelentwicklung bieten als die hoch spezifisch wirkenden Rezeptorantagonisten für Lipoxigenaseprodukte, da letztere immer nur eine einzige Gruppe von Entzündungsmediatoren ausschalten, wohingegen ein Lipoxigenasemhemmer gleichzeitig die Biosynthese mehrerer dieser Mediatoren (Leukotrien B₄, Peptidoleukotriene, Lipoxine, verschiedene Hydroxyeicosatetraensäuren u. a.) unterdrückt.

Es ist deshalb überraschend, daß die von ihrer Struktur her einfach gebauten 2-Hydroxyphenylsubstituierten 1,2,4-Oxadiazole und 1,2,4-Triazole der allgemeinen Formel I



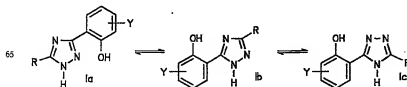
worin

X NH oder O bedeutet,

R Alkyl, Cycloalkyl, Phenyl, Naphthyl, wobei Phenyl- und Naphthylreste gegebenenfalls durch einen oder mehrere gleiche oder verschiedene Substituenten, wie z. B. Alkyl, Phenyl substituiert sein können, darstellt und Y Wasserstoff oder ein oder mehrere gleiche oder verschiedene Substituenten, wie z. B. Alkyl, Alkoxy, Halogen, Hydroxy, Nitro, Trifluormethyl, sein können,

stark die menschliche 5-Lipoxigenase und auch die Sojabohnen-Lipoxigenase und hemmen.

Für den Fachmann ist ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen 1,2,4-Triazole in einem Tautomerengleichgewicht vorliegen können, wie es in den allgemeinen Formeln Ia bis Ic dargestellt ist. Unter normalen Bedingungen sind die einzelnen Individuen jedoch nicht zu isolieren. Die Erfindung schließt alle tautomeren Formen ein. Zur Vereinfachung dieser Erfindungsbeschreibung und unter Berücksichtigung der bevorzugten 1H-Form der 1,2,4-Triazole werden die erfindungsgemäßen Verbindungen in Form der Formel Ia geschrieben.



Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind zum Teil bereits aus der Literatur bekannt. Für die Herstellung von 1,2,4-Oxadiazolen und 1,2,4-Triazolen sind bisher vielfältige Syntheseverfahren in der Literatur beschrieben. Eine Auswahl der erfindungsgemäßen Verbindungen ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Auswahl typischer Vertreter der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel

| Lfd.Nr. | Chemische Bezeichnung | Schmelzbereich |
|---------|--------------------------------------------------------|----------------|
| 1 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-phenyl-1,2,4-oxadiazol | 127-29 °C |
| 2 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol | 72-73 °C |
| 3 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-(naphth-1-yl)-1,2,4-oxadiazol | 129-32 °C |
| 4 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-(naphth-2-yl)-1,2,4-oxadiazol | 154-57 °C |
| 5 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-(biphenyl-4-yl)-1,2,4-oxadiazol | 150-52 °C |
| 6 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-(4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol | 127-29 °C |
| 7 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazol | 32-35 °C |
| 8 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-phenyl-1,2,4-triazol | 230-32 °C |
| 9 | 3-(2-Hydroxy-5-chlorphenyl)-5-phenyl-1,2,4-triazol | 261-63 °C |
| 10 | 3-(2-Hydroxyphenyl)-5-methyl-1,2,4-triazol | 168-71 °C |
| 11 | 3-(2-Hydroxy-5-chlorphenyl)-5-methyl-1,2,4-triazol | 193-96 °C |

Die 1,2,4-Oxadiazole lassen sich am besten nach S. Chiou und H.J. Shine (J. Heterocyclic Chem. 26, (1989), 125) aus den entsprechenden Amidoximen und Carbonsäurechloriden in einem Syntheseschritt herstellen. Bekannt ist ebenfalls die Umsetzung von Amidoximen und (substituierten) Aldehyden zu den entsprechenden 1,2,4-Oxadiazolen und deren Oxidation zu den 1,2,4-Oxadiazolen (H. Zimmer, Chem. Ber. 22, (1889), 3140).

Die 1,2,4-Triazole sind sowohl über die Einhorn-Brunner-Reaktion aus Diacylaminen und Hydrazin als auch durch die Pelizzari-Reaktion aus Amidinen und Hydraziden zugänglich. Als geeignet erwies sich die Kondensation von Amidinen mit Hydraziden und die nachfolgende thermische Cyclisierung der gebildeten Acylamidrazone nach J.E. Francis und Mitarbeiter (Tetrahedron Lett. 28, (1987), 5133). Die dazu notwendigen Vorprodukte wurden nach literaturbekannten Verfahren synthetisiert.

Die Werte für die Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase (SB-LOX) und der menschlichen 5-Lipoxygenase (5-LOX) durch einige erfindungsgemäße Verbindungen sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase (SB—LOX) und der menschlichen 5-Lipoxygenase (5-LOX)

5

| 10 | Substanz Nr. aus Tab. 1 | SB-LOX | 5-LOX | | |
|----|----------------------------|------------------------------------------------|---------------------|---------------------------|--------|
| | | IC ₅₀ (µM) bzw. % Hemmung bei µM | % Hemmung bei 10 µM | | |
| | | | LTB ₄ | LTB ₄ -Isomere | 5-HETE |
| 15 | 1 | 38,0 bei 500 | 60 | 80 | 63 |
| | 2 | 3300 | 60 | 40 | 45 |
| | 3 | 8,0 bei 100 | 24 | 33 | |
| 20 | 4 | 25,8 bei 100 | 72 | 72 | 84 |
| | 5 | 23,6 bei 100 | | | |
| | 6 | 48,0 bei 100 | | | |
| 25 | 7 | 12,7 bei 100 | 31 | 36 | 30 |
| | 8 | 165 | | | 50 |
| | 9 | 57 | 75 | 85 | 65 |
| 30 | 10 | 9,6 bei 100 | | | |
| | 11 | 30,0 bei 100 | | | |

35 Die Prüfung auf SB—LOX-Hemmung erfolgte nach der von P. Nuhn und Mitarbeiter T. Köhler, J. Landgraf, P. Nuhn, Pharmazie 43, (1988), 178) beschriebenen Methode, die in Kurzfassung folgendes beinhaltet:

Mittels Sauerstoffelektrode wird der Zeitverlauf des Sauerstoffverbrauchs bei der durch die SB—LOX katalysierten Peroxygenierung des Substrats Linolsäure in vitro registriert. Die Anfangsgeschwindigkeiten des Sauerstoffverbrauchs ist ein Maß für die Enzymaktivität. Die Reaktion wird nacheinander in Ab- und Anwesenheit des potentiellen Lipoxygenaseinhibitors durchgeführt und die Reaktionsgeschwindigkeiten werden miteinander verglichen.

Die Übertragbarkeit der ermittelten SB—LOX-Hemmung auf die Hemmung der für die verschiedenen pathophysiologischen Prozesse verantwortlichen menschlichen 5-LOX sollte aus dem gegenwärtigen Kenntnisstand zu vergleichenden Lipoxygenase-Untersuchungen gegeben sein.

45 Die Prüfung der Hemmwirkung auf die 5-Lipoxygenase erfolgte nach der von P. Nuhn und Mitarbeiter (Köhler, T. u. a., Biochem. Pharmacol. 44, (1992), 805) beschriebenen ex-vivo-Methode. Es wurde die Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen auf die 5-Lipoxygenase von aus menschlichem Blut isolierten, polymorphkernigen, neutrophilen Leukozyten (PMNL) bestimmt. Dabei kann man sowohl die Fähigkeit der Verbindungen untersuchen, die biologische Membran der intakten Leukozyten zu passieren als auch deren Einfluß auf die intrazelluläre Bildung der 5-LOX-Stoffwechselprodukte 5-HETE, LTB₄, 6-trans-LTB₄ und 12-epi-6-trans-LTB₄ verfolgen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I können in bekannter Weise zu pharmazeutischen Zubereitungen, die neben geeigneten, nicht toxischen, pharmazeutisch inerten festen oder flüssigen Trägerstoffen, Füllstoffen, Formulierungshilfsmitteln und ggf. anderen Zusatzmitteln, wie z. B. zum Färben oder zur Verbesserung des Geruchs oder des Geschmacks, eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Verbindungen enthalten, verarbeitet werden. Bevorzugte pharmazeutische Zubereitungen sind Tabletten, Dragees, Kapseln, Pillen, Granulate, Sirupe, Lösungen, Suppositorien, Emulsionen, Pasten, Salben, Gele, Cremes, Lotionen, Puder, Sprays, Aerosole und Zerstäubungspräparate für inhalative Applikation. Der oder die Wirkstoffe können auch zu Mikrokapseln oder auch zusammen mit anderen geeigneten pharmazeutischen Wirkstoffen zu den oben angegebenen pharmazeutischen Zubereitungen verarbeitet werden. Die therapeutisch wirksamen Verbindungen können in den oben genannten Zubereitungen in 0,1 bis 99,9 Masseprozenten, vorzugsweise von 0,5 bis 90 Masseprozenten, enthalten sein. Die Wirkstoffe oder die daraus hergestellten Zubereitungen können lokal, oral, parenteral, intraperitoneal und/oder rektal appliziert werden. Die Dosierungen liegen im allgemeinen in einem Bereich zwischen 0,05 und 100 mg/kg Körpermasse, vorzugsweise zwischen 0,1 und 50 mg/kg Körpermasse innerhalb von 24 Stunden, können aber in besonderen Fällen nach oben oder unten abweichen. Die Applikation kann als Einzelgabe oder in mehreren Teilgaben erfolgen.

I. Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher, ohne sie aber einzuschränken.

Beispiel 1

3-(2-Hydroxyphenyl)-5-(naphth-2-yl)-1,2,4-oxadiazol

Es werden 3,04 g (0,02 Mol) Salicylamidoxim in 20 ml Pyridin gelöst. Unter Rühren tropft man langsam 3,7 g (0,02 Mol) 2-Naphthoylchlorid, gelöst in 10 ml Pyridin, zu. Anschließend läßt man 2 h am Rückfluß kochen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur füllt man durch Zugabe von 100 ml Wasser das Reaktionsprodukt aus. Der kristalline Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Zur weiteren Reinigung wird das 1,2,4-Oxadiazol in Methanol gelöst und mit einem Überschuß einer methanolischen Lösung von Kupfer(II)acetat versetzt. Man kocht 5 min am Rückfluß, kühlt anschließend und saugt den ausgefallenen Kupfer(II)-Oxadiazol-Komplex ab. Der Komplex wird mit Methanol gewaschen und anschließend in verdünnter Salzsäure suspendiert. Nach kurzem Erwärmen zersetzt sich der Komplex unter Ausscheidung des 1,2,4-Oxadiazols. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Abschließend wird aus Benzin umkristallisiert. Es werden 3,25 g (56,4% d.Th.) des 1,2,4-Oxadiazols erhalten; $F_p = 154-57^{\circ}\text{C}$.

Beispiel 2

3-(2-Hydroxyphenyl)-5-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazol

Es werden 3,04 g (0,02 Mol) Salicylamidoxim in 20 ml Pyridin gelöst. Unter Rühren tropft man langsam 2,92 g (0,02 Mol) Cyclohexancarbonsäurechlorid zu. Anschließend läßt man 2 h am Rückfluß kochen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 100 ml Wasser zugesetzt. Dabei scheidet sich ein Öl ab. Nach dem Anstüern mit Salzsäure wird das Reaktionsprodukt mehrfach mit Diethylether extrahiert. Die Etherphasen werden vereinigt und mit Wasser gewaschen. Der Ether wird abdestilliert und der Rückstand wird nach dem Lösen in Methanol wie unter Beispiel 1 beschrieben über den Kupfer-Komplex gereinigt. Nach der Komplexzerse-
tzung wird wieder ein Öl erhalten, welches aus wäbrigem Methanol bei -10°C zur Kristallisation gebracht wird.

Es werden 1,85 g (37,9% d.Th.) des 1,2,4-Oxadiazols erhalten; $F_p = 32-35^{\circ}\text{C}$.

Beispiel 3

3-(2-Hydroxyphenyl)-5-(4-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazol

Es werden 3,04 g (0,02 Mol) Salicylamidoxim in 20 ml Pyridin gelöst. Unter Rühren tropft man langsam 3,09 g (0,02 Mol) 4-Methylbenzoylchlorid zu. Anschließend läßt man 2 h am Rückfluß kochen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 100 ml Wasser zugesetzt. Der dabei ausgefallene Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Nachfolgend wird eine Reinigung nach Beispiel 1 über den Kupfer-Komplex durchgeführt. Abschließend wird aus Methanol unter Aktivkohlezusatz umkristallisiert. Es werden 2,24 g (44,6% d.Th.) des 1,2,4-Oxadiazols erhalten; $F_p = 127-29^{\circ}\text{C}$.

Beispiel 4

3-(2-Hydroxy-5-chlorphenyl)-5-phenyl-1,2,4-triazol

Es werden 4,2 g Benzamidinhydrochlorid (0,0215 Mol) in 35 ml absolutem Ethanol gelöst. Unter Rühren werden bei Raumtemperatur 1,9 g (0,036 mol) Natriummethylat, gelöst in 35 ml absolutem Ethanol, langsam zugetropt. Nach 45 min wird das ausgefallene Natriumchlorid abgesaugt. Das Filtrat wird mit 3,36 g (0,018 Mol) 5-Chlorsalicylhydrazid versetzt. Man läßt 10 h am Rückfluß kochen und saugt nach dem Abkühlen den ausgefallenen Feststoff ab. Abschließend wird unter Zusatz von Aktivkohle aus wäbrigem Aceton umkristallisiert.

Es werden 2,0 g (40,9% d.Th.) des 1,2,4-Triazols erhalten; $F_p = 261-63^{\circ}\text{C}$.

Beispiel 5

3-(2-Hydroxy-5-chlorphenyl)-5-methyl-1,2,4-triazol

Es werden 4,23 g (0,045 Mol) Acetamidinhydrochlorid in 40 ml absolutem Ethanol gelöst. Unter Rühren werden bei Raumtemperatur 2,43 g (0,045 mol) Natriummethylat, gelöst in 20 ml absolutem Ethanol, langsam zugetropt. Nach 45 min wird das ausgefallene Natriumchlorid abgesaugt. Das Filtrat wird mit 5,58 g (0,03 Mol) 5-Chlorsalicylhydrazid versetzt. Man läßt weitere 8 h bei Raumtemperatur rühren und anschließend über Nacht stehen.

Nach dem Abdestillieren des Ethanols im Vakuum werden 50 ml Xylen zugegeben. Man läßt 2 h am Wasserabscheider kochen. Die unlösliche, wachsartige Masse kristallisiert nach dem Abkühlen auf -10°C . Nach dem Absaugen wird unter Aktivkohlezusatz aus wäbrigem Acetonitril umkristallisiert.

Es werden 1,5 g (23,9% d.Th.) des 1,2,4-Triazols erhalten; Fp = 193–96°C.

II. Bestimmung der Lipoxigenase-Hemmung

Die Isolation der Leukozyten erfolgt nach der Methode von Boyum (Boyum, A. Scan. J. Clin. Lab. Invest 21 Suppl. 97, (1968), 77), modifiziert nach Ludwig und Heinisch aus menschlichem Blut. Dieses wird sofort nach der Entnahme heparinisiert (10 I.E./ml).

Nach der Zugabe von 20 ml Dextran-70-Lösung (6%ig) und dem Aufteilen auf Zentrifugengläser, bleiben diese Gläser bei 37°C stehen, bis das obere Drittel der Proben von Erythrozyten weitgehend frei ist. Dieser leukozytenreiche Überstand wird einer Dichtegradientenzentrifugation durch Zugabe von Ficoll-Paque-Lösung (Pharmacia) unterworfen. Der Überstand wird abgesaugt. Das Zellpellet wird mit isotonischem PBS-Puffer pH = 7,4 mehrfach gewaschen. Die restlichen Erythrozyten werden durch kurzzeitige Schaffung eines hypotonen Mediums lysiert. Am Ende der Prozedur erhält man ein weißes Zellpellet mit etwa 95% PMNL. Mit HBS-Puffer wird eine Zellkonzentration von 5 Millionen Zellen/ml eingestellt.

Nach Zugabe von 5 µl des potentiellen Hemmers bzw. des Lösungsmittels (Kontrolle) zu 1 ml der auf 37°C temperierten Zellsuspension erfolgt die Stimulation der 5-LOX-Reaktion durch A 23187 (Endkonzentration 5 pmol/l). Die Reaktion wird nach 5 min mit kaltem Methanol beendet.

Die Extraktion von 5-HETE und der Leukotriene wird mit Hilfe der Festphasenextraktion an RP-18-Trennsäulen (J.T. Baker, Philipsburg) mit 2 ml reinem Methanol durchgeführt. Nach dem Einengen des Lösungsmittels unter Reinstoffdruck wird der Rückstand mit 100 µl Methanol (80 vol.-%ig) aufgenommen. 40 µl dieser Lösungen werden in den Hochleistungsflüssigchromatographen (HPLC) injiziert. Die Probenvorbereitung erfolgt in silikonisierten Gefäßen.

HPLC-Arbeitsbedingungen:

Gerät: Hewlett-Packard 1084 B Liquid Chromatograph

Säule: LiChrospher RP-18 (4,6 x 250 mm; 10 µm Partikelgröße)

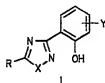
Fluß 1 ml/min

Mobile Phase: Methanol/Wasser/Essigsäure 79/21/0,1 v/v/v

Detektion: UV bei 270 nm für LTB₄ und Isomeren; 235 nm für 5-HETE.

Patentsprüche

1. Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen Gehalt an 3-(2-Hydroxyphenyl)-1,2,4-oxadiazolen und/oder an 3-(5-(2-Hydroxyphenyl)-1,2,4-triazolen der allgemeinen Formel I



worin

X NH oder O bedeutet,

R Alkyl, Cycloalkyl, Phenyl, Naphthyl, wobei Phenyl- und Naphthylreste gegebenenfalls durch einen oder mehrere gleiche oder verschiedene Substituenten, wie z. B. Alkyl, Phenyl substituiert sein können, darstellt und

Y Wasserstoff oder ein oder mehrere gleiche oder verschiedene Substituenten, wie z. B. Alkyl, Alkoxy, Halogen, Hydroxy, Nitro, Trifluormethyl, sein können.

2. Verwendung von 2-hydroxyphenylsubstituierten 1,2,4-Oxadiazolen und/oder 2-hydroxyphenylsubstituierten 1,2,4-Triazolen gemäß Anspruch 1 als Lipoxigenasehemmer zur Behandlung und/oder Prophylaxe von allen Formen des Asthma bronchiale, von entzündlichen und allergischen Erkrankungen verschiedener Organe (z. B. Lunge, Leber, Niere, Herz, Auge), von Schockzuständen, von Hautkrankheiten — insbesondere Psoriasis und polymorphen Lichtdermatosen, bei ischämischen Zuständen des Gehirns, zur Nachbehandlung des Herzinfarktes sowie bei der Organtransplantation zur Verhütung der Transplantatabstoßung.

3. Pharmazeutische Zubereitungen, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine oder mehrere Verbindungen der allgemeine Formeln I gemäß Anspruch 1 enthalten.